Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Virologie

Direktor: Prof. Dr. P. Naumann

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PFERDESERUMPROTEINE IN DER MEMBRAN VON MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

WOLFGANG STEHLE

1982

UNIV.
LEIDEN
NED.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0152

Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Virologie

Direktor: Prof. Dr. P. Naumann

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PFERDESERUMPROTEINE IN DER MEMBRAN VON MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

WOLFGANG STEHLE

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent:
gez.: Prof. Dr. Brunner

Korreferent:
gez.: Prof. Dr. Grün

Für meine Eltern und Doris

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II	Literaturübersicht	5
III	Material und Methoden	11
	1. Organismen	12
	2. Wachstumsmedium	12
	3. Wachstumsbedingungen	12
	4. Waschen und Ernten der Organismen	13
	5. Verwendete Puffer	13
	6. Gewinnung von Membranen	14
	7. Reinigung von Membranproteinen	14
	8. Immunisierung von Kaninchen	15
	9. Komplementbindungsreaktion	16
	10. Behandlung von Membranen mit Triton X-100	16
	11. Proteinbestimmung in Triton-haltigen Lösungen	17
	12. Gekreuzte Immunelektrophorese	18
	13. Tandem-Immunelektrophorese	19
	14. Zwischengelelektrophorese	20
	15. Agarosegelelektrophorese	22
	16. Doppel-Immundiffusion (Ouchterlony-Test)	22

Seite

IV. Ergebnisse 24

1. Agarosegelelektrophorese 24

2. Gekreuzte Immunelektrophorese mit Humanserum 25

3. Komplementbindungsreaktion 25

4. Antigenvergleich der Membranen eines avirulenten und eines virulenten Stammes von M. pneumoniae 26

4.1. Gekreuzte Immunelektrophorese 26

4.2. Tandem-Immunelektrophorese 28

5. Nachweis von Pferdeserumantigenen in den Membranpräparationen 29

5.1. Zwischengelelektrophorese 29

5.2. Gekreuzte Immunelektrophorese mit Pferdeserum 32

6. Untersuchungen an den Überständen nach Waschen der Membranen 33

6.1. Gekreuzte Immunelektrophorese mit Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine 34

6.2. Gekreuzte Immunelektrophorese mit Antiserum gegen Pferdeserumprotein 35

6.3. Tandem-Immunelektrophorese 36

7. Doppel-Immundiffusion 37

V. Diskussion 39

Seite

VI. Zusammenfassung 44

VII. Literaturverzeichnis 46

I. EINLEITUNG

Mycoplasmen wurden 1898 erstmals beschrieben. NOCARD und ROUX fanden M. mycoides als Erreger der infektiösen Peripneumonie der Rinder. In der folgenden Zeit wurden weitere Mycoplasmen-Species bei Tieren und Pflanzen und in Abwässern gefunden. 1937 beschrieben DIENES und EDSALL erstmals ein Mycoplasma im Zusammenhang mit einer menschlichen Erkrankung. Sie wiesen Mycoplasma hominis in einer vereiterten Bartholin'schen Drüse nach. 1944 berichteten EATON und Mitarbeiter, daß sie bei einem Teil der Fälle von primär atypischer Pneumonie ein Agens gefunden hätten, das Bakterienfilter passierte, in Hühnerembryonen gezüchtet werden konnte und in Versuchstieren (Hamstern und Baumwollratten) eine Pneumonie hervorrief. Erste Zweifel an der Virusnatur des "Eaton Agent" ergaben sich, als sich zeigte, daß es gegenüber Chlortetracyclin und Streptomycin empfindlich war. 1962 wurde der Erreger von CHANOCK und Mitarbeitern auf zellfreiem Nährmedium gezüchtet und als Mycoplasma identifiziert.
Der Name "Mycoplasma" geht zurück auf einen Vorschlag von EDWARD und FREUNDT (1956). 1967* wurden die Mycoplasmen als Klasse der Mollicutes von den Eubakterien abgetrennt.

---

* vgl: Razin, S.: The Mycoplasmas, in: Microbiological Reviews 42, 414-470, 1978.

Die taxonomische Position von Mycoplasma pneumoniae ergibt sich wie folgt:

Klasse:	Mollicutes
Ordnung:	Mycoplasmatales
Familie:	Mycoplasmataceae
Gattung:	Mycoplasma
Art:	Mycoplasma pneumoniae

Mycoplasmen sind mit einem Durchmesser von 330-1000 nm die kleinsten bekannten Prokaryonten mit autonomem Stoffwechsel. Ihr Genom ist das kleinste, das für selbstreproduzierende Mikroorganismen bekannt ist. Folglich ist ihr Synthesespektrum sehr begrenzt. Dies bedeutet, daß sie hohe Ansprüche an das Nährmedium stellen müssen. Cholesterin, das in die Membran eingebaut wird, sowie natives Protein sind für die Züchtung der parasitären Mycoplasmen unbedingt erforderlich. Mycoplasmen besitzen keine Zellwand, daher der Name "Mollicutes". Da die parasitären Mycoplasmen ohne Zellwand Serumfaktoren wie z.B. spezifischen Antikörpern und Komplementfaktoren wehrlos ausgesetzt sind, leben sie als Oberflächenparasiten des Urogenital- und Respirationstraktes.

Nachdem es gelungen war, Mycoplasma pneumoniae auf zellfreien Medien zu züchten, konnten verschiedene Mechanismen aufgezeigt werden, mit denen Mycoplasma pneumoniae bei seinem Wirt eine Schädigung hervorrufen kann und sich auf der anderen Seite vor dem Zugriff der Wirtsabwehr schützt. BRUNNER (1979) führt folgende Pathogenitätsmechanismen von Mycoplasma pneumoniae auf:

1. Beweglichkeit, die es dem Erreger ermöglicht, sich aktiv auf seine Zielzellen zuzubewegen. Dabei ist eine spezielle Spitzenstruktur der vorangehende Teil.
2. Die Fähigkeit zur Adhärenz mit Hilfe eines sogenannten "Attachment Factor", dessen Proteinnatur wahrscheinlich gemacht werden konnte.
3. Toxinbildung, u.a. die Sekretion von H_2O_2, das die Mikroorganismen bei der Energiebildung erzeugen.
4. Immunologische Mechanismen. Hierfür sprechen einerseits das Auftreten von Autoimmunphänomenen während der Erkrankung, andererseits aber auch Hinweise, daß die Schwere der Erkrankung mit der Anzahl der vorhergehenden Kontakte mit dem Erreger im Sinne einer Sensibilisierung zunimmt.
5. Schutz vor der Wirtsabwehr durch biologische Besonderheiten des Erregers.

BREDT (1976) führt als biologische Besonderheiten in diesem Sinne an:

1. Eine im Vergleich zu Eubakterien geringere Anzahl von Antigenen, die ein Mycoplasma immunologisch weniger "auffällig" macht.
2. Engsten Kontakt zur Wirtszelle, der den Zugriff des humoralen und zellulären Immunsystems erschwert.
3. Adsorption von Wirtsantigenen an Mycoplasmamembranen, was eine immunologische Tarnung des Erregers bewirken könnte.

Das Phänomen einer Adsorption von Fremdantigenen ist für Mycoplasma pneumoniae von LIPMAN et al. (1969) sowie von SETHI und BRANDIS (1972) u.a. nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit wurde es mit Hilfe der gekreuzten Immunelektrophorese nach CLARKE und FREEMAN (1966) untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Membranen von Mycoplasma pneumoniae gereinigt und mit einem Detergenz behandelt. In Kaninchen wurden Antiseren gegen M. pneumoniae-Membranproteine erzeugt. Ein kommerzielles Antiserum gegen Pferdeserumproteine wurde zum direkten Nachweis von Antigenen des Pferdeserums, das Teil des Kulturmediums für Mycoplasma pneumoniae bildete, in den Membranen eingesetzt. Des weiteren wurde ein Konzentrat der Waschflüssigkeiten aus den Membranwaschungen untersucht.

II. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

Die Adsorption von Mediumproteinen an Zellen von Eukaryonten und Prokaryonten ist in der Literatur wohldokumentiert. HAMBURGER et al. (1963) zeigten, daß Proteine des den Nährmedien zugesetzten Pferdeserums von HeLa- und anderen in Zellkulturen gezüchteten Zellen auch nicht durch intensives Waschen zu entfernen waren. Injektion gewaschener Zellen in Kaninchen resultierte in der Bildung von Antikörpern u.a. gegen Mediumproteine. Diese Antikörper ließen sich im Ouchterlony-Test und in der Komplementbindungsreaktion nachweisen. Eine Serumkomponente, gegen die Antikörper gebildet worden waren, ließ sich als Pferde-Gammaglobulin identifizieren.

HAMBURGER und MILLS (1964) konnten zeigen, daß Säugerzellen durch Antikörper gegen Mediumproteine, die während der Züchtung adsorbiert worden waren, in Anwesenheit von Komplement zerstört wurden.

KING zeigte 1968, daß für die Ablösung von Serumproteinen, die an Lungengewebsscheiben des Meerschweinchens gebunden waren, relativ hohe Harnstoffkonzentrationen erforderlich waren. Er machte Thiol-Gruppen auf der Zellmembran für die Adsorption verantwortlich.

Auch für Mycoplasmen ist die Adsorption von Proteinen aus dem Wachstumsmedium wiederholt beschrieben

worden. KENNY (1969) schätzte aufgrund von Untersuchungen an zehn glycolytischen Mycoplasma-Species (u.a. M. pneumoniae, M. fermentans, M. gallisepticum und A. laidlawii), daß etwa 1 Gewichtsprozent des Gesamtproteins aus dem Pferdeserum des Wachstumsmediums stammte. Die Organismen waren 3 x in TES-Puffer n tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure gewaschen worden.

LIPMAN et al. (1969) fanden bei Untersuchungen zur Charakterisierung der Virulenzfaktoren von Mycoplasma pneumoniae in der Polyacrylamidgelelektrophorese der Organismen 5 Pferdeserumproteine.

SETHI und BRANDIS (1972) konnten zeigen, daß das Wachstum von M. pneumoniae und M. gallisepticum auf Pferdeserum-haltigen Medien durch den Zusatz von Antikörpern gegen Pferdeserum und Komplement gehemmt wurde.

HANSEN et al. (1979) fanden bei Untersuchungen an M. pneumoniae mit einer zweidimensionalen Gelelektrophoresemethode ein Protein aus dem Wachstumsmedium, das sie vorläufig als Pferdeserum-Albumin identifizierten.

BALL und TODD (1978) untersuchten Mycoplasma-Species, die bei verschiedenen Warmblütern Pneumonien hervorrufen im Ouchterlony-Test. Sie fanden eine Verunreinigung ihres Antigenmaterials mit Bestandteilen des Wachstumsmediums.

1968 wurde von JORDAN und KULASEGARAM die Adsorption von Mediumbestandteilen bei M. gallisepticum gezeigt. Die Organismen waren auf Schweineserum-haltigen Medien gezüchtet worden. Seren von Hühnern, die intratracheal mit diesen Organismen inoculiert worden waren, zeigten im Ouchterlony-Test mit Medium 3 Präzipitate. Im Ouchterlony-Test ließ sich auf den Organismen noch nach der zehnten Waschung mit PBS (phosphate-buffered saline) Mediumantigen nachweisen, im Agglutinationstest sogar noch nach der zwölften Waschung. In zwei Veröffentlichungen 1971 und 1972 brachten BRADBURY und JORDAN eine nähere Charakterisierung der von M. gallisepticum adsorbierten Proteine. Sie benutzten dazu die Immunelektrophorese. Sie konnten IgG, ein Protein mit der Beweglichkeit von IgM, ein Protein mit Alpha-Globulin-Beweglichkeit, ein Lipoprotein, das im Präalbuminbereich wanderte, und ein Beta-Globulin nachweisen.

Auch für weitere Mycoplasma-Species ist eine Adsorption exogener Proteine nachgewiesen worden. So zeigten WILLIAMS et al. (1970), daß M. fermentans IgG verschiedener Säugerspezies binden kann. M. fermentans, das auf Humanserum-haltigen Medien gezüchtet worden war, wurde von Rheumafaktor (Anti-Human-IgG) agglutiniert. Das gebundene Immunglobulin konnte durch Harnstoffbehandlung zum größten Teil entfernt werden.

CLARK et al. (1969) beschrieben für M. salivarium, M. pharyngis und M. hominis Unterschiede im Banden-

muster der Polyacrylamidgelelektrophorese in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums. Züchtung der verschiedenen Mycoplasma-Species auf dem gleichen Medium ergab jedoch keine gemeinsamen Präzipitatlinien im Ouchterlony-Test.

HOLLINGDALE und LEMCKE (1972) züchteten M. hominis auf Medium, das Humanserum enthielt. Sie konnten eine Adsorption von Gamma-Globulin aus dem Medium nachweisen.

SLUTZKY et al. (1976) untersuchten den Mechanismus der Cholesterinaufnahme durch M. hominis und A. laidlawii aus Serum-Lipoproteinen. Sie fanden dabei, daß zwar im wesentlichen Cholesterin, aber auch ein geringer Teil der Proteinkomponente in die Membran eingebaut wurde.

MASOVER et al. (1975) untersuchten den Einfluß des Wachstumsmediums auf Stämme von Ureaplasma urealyticum (T-Stämme). Sie fanden in den meisten Versuchen im Ouchterlony-Test Präzipitationslinien von Anti-Mycoplasma-Seren mit Mediumbestandteilen.

In einigen Publikationen sind die Eigenschaften und Bedingungen der Bindung löslicher Proteine an Mycoplasma-Membranen näher untersucht worden. ROTTEM et al. (1971) konnten durch Membran-Reaggregation Penicillinase in Membranen von A. laidlawii einbauen. Sie zeigten, daß beim Einbau solcher löslicher Proteine hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen.

RAZIN et al. (1973) und ROTTEM et al. (1973) zeigten, daß die Bindung solcher löslicher Proteine überwiegend an Membranlipide stattfindet. Sie wiesen nach, daß die Reduktion des Lipidgehaltes von A. laidlawii-Membranen mittels wäßriger Aceton-Extraktion die Proteinbindungsfähigkeit nahezu vollständig beseitigte. Sie untersuchten im einzelnen die Bindungsfähigkeit der Membranen für Lysozym, Cytochrom C und Rinderserum-Albumin (BSA). Lysozym und Cytochrom C wurden in größeren Mengen als BSA gebunden, allerdings durch 1 M NaCl-Lösung quantitativ wieder entfernt. BSA wurde hingegen weitaus fester gebunden. Für die Bindung der Proteine waren der pH-Wert, die Temperatur und die Ionenstärke des Mediums von Bedeutung.

YAGUZHINSKAYA (1977) veröffentlichte Befunde, die gegen eine tatsächliche Adsorption exogener Proteine an Mycoplasma-Membranen sprachen. Die Autorin schloß aus Untersuchungen an A. laidlawii und M. arthritidis, daß eine Verunreinigung von Membranmaterial mit Bestandteilen des Wachstumsmediums in erster Linie auf bei der Zentrifugation mit den Mycoplasmen gleichzeitig im Niederschlag erscheinenden, unlöslich gewordenen Mediumbestandteilen beruht. Die Verunreinigungen konnten durch zweifache Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation entfernt werden. Die Autorin räumte freilich ein, auch eine echte Adsorption nicht völlig ausschließen zu können, und wies dabei beson-

ders auf die oben erwähnten Befunde von SETHI und BRANDIS, die nur durch eine echte Adsorption erklärt werden können, hin.

Wir wollten zum Nachweis des Einbaus von Mediumbestandteilen in die Membran von Mycoplasma pneumoniae die Methode der gekreuzten Immunelektrophorese einsetzen. Diese Methode geht auf LAURELL (1965) zurück. Sie gab als ihren Vorteil gegenüber der herkömmlichen Immunelektrophorese an, daß sie das Verwischen der scharfen Auftrennung der Proteine während des sich an die Elektrophorese anschließenden Diffusionsschrittes vermeidet, indem sie diesen durch einen zweiten Elektrophoreseschritt ersetzt, der im rechten Winkel zur ersten Laufrichtung liegt.

CLARKE und FREEMAN (1966) ersetzten als Modifikation der Laurell'schen Methode das schlitzförmige Antigendepot durch ein rundes Loch. Sie konnten etwa dreißig Proteine des menschlichen Serums mit dieser Methode unterscheiden.

THIRKILL und KENNY (1974, 1975) sowie ALEXANDER und KENNY (1977, 1978) benutzten für die Analyse von Mycoplasmen-Antigenen in der gekreuzten Immunelektrophorese Triton X-100 als Detergenz, JOHANNSON und HJERTEN (1974) das Detergenz Tween 20, WROBLEVSKY und RATANASAVANH (1976) Natriumdesoxycholat.

Die Methode der Digitoninlyse zur Gewinnung von Mycoplasma-Nembranen wurde von ROTTEM und RAZIN (1972) erstmals angewandt am Beispiel von M. hominis.

III. MATERIAL UND METHODEN

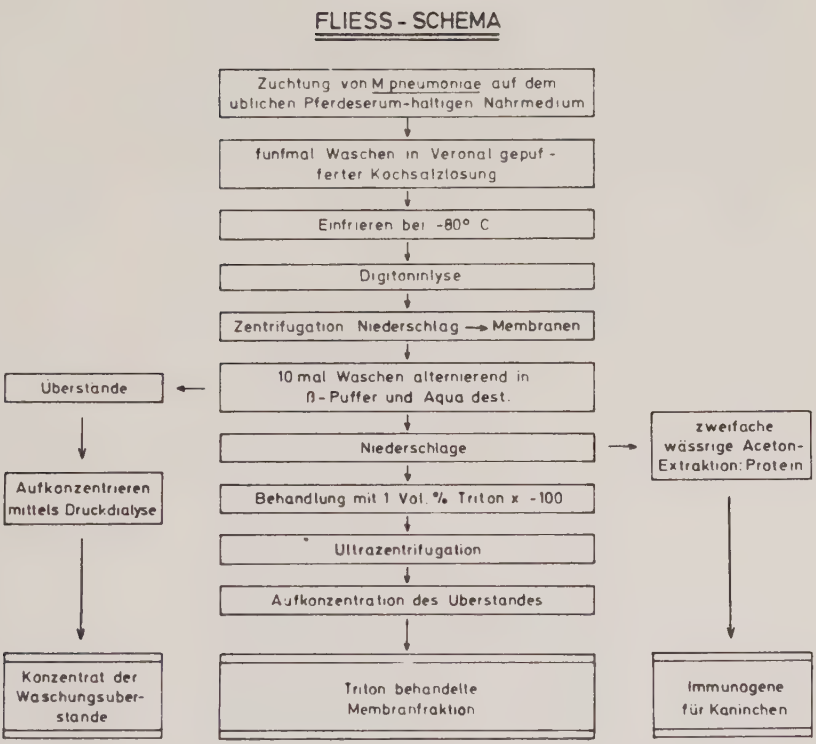

Abb. 1 Das Fließschema gibt einen Überblick über die Abfolge der Arbeitsgänge, die zu den für die Versuche benützten Fraktionen führten.

1. Organismen

Verwendet wurde der FH-Stamm von Mycoplasma pneumoniae, der sich in seiner 298. Passage auf zellfreiem Kulturmedium befand.
Als Beispiel eines virulenten Stammes wurde der Stamm PI 1428 gewählt. Dieser Stamm war ursprünglich von einem Marinerekruten auf Parris Island isoliert worden und befand sich in seiner 5. Kulturpassage.

2. Wachstumsmedium

Das Wachstumsmedium für Mycoplasma pneumoniae hatte folgende Zusammensetzung (9):

Mycoplasma Broth Medium mit 20% Agamma-Pferdeserum (Baltimore Biological Laboratories Cockeysville MD)
1% Glucose
0,002% Phenolrot
0,05% Thalliumacetat
1000 I.E. Penicillin G / ml

Das Medium wurde mit 0,1 N NaOH auf einen pH von 7,6 eingestellt.

3. Wachstumsbedingungen

Mycoplasma pneumoniae wurde bei 37° C an der Glasoberfläche von 5l-Povitsky-Flaschen gezüchtet, die 1 l Medium enthielten. Die Organismen wurden 5-6 Tage gezüchtet bis das Medium einen pH von etwa 7,0 erreicht hatte.

4. Waschen und Ernten der Organismen

Nach Abgießen des Mediums wurden die Mycoplasmen 5 x mit je 100 ml Veronal-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurde der an der Glasoberfläche haftende Zellrasen abgekratzt und in 30 ml Veronal-gepufferter Kochsalzlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei -80° C eingefroren. Der Proteingehalt nach LOWRY (28) betrug für den Stamm FH: 3,64 mg/ml, für den Stamm PI: 1,25 mg/ml.

5. Verwendete Puffer

5.1. Puffer für die Immunelektrophorese nach SVENDSEN (3):

Puffer 1	Barbital-Na	65,00 g
	Barbital	10,35 g
Puffer 2	Glycin	281,00 g
	Tris*	226,00 g

Beide Puffer wurden in je 5 l destilliertem Wasser gelöst. Für die Immunelektrophorese fand ein Gemisch zu gleichen Teilen aus beiden Puffern Anwendung. Dieser Puffer besaß einen pH von 8,8, eine Ionenstärke von 0,09 und eine hohe Pufferkapazität.

5.2. Beta-Puffer zum Waschen von Membranen:

pro Liter	
NaCl	8,75 g
Tris*	6,05 g

---

* Tris ist Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Mercaptoäthanol 0,78 g

Aqua dest. 1000,00 ml

pH 7,4

5.3. Puffer für den Ouchterlony-Test:

0,025 M Barbital/HCl-Puffer

pH 8,6

6. Gewinnung von Membranen

Die Lyse der osmotisch resistenten Mycoplasma pneumoniae-Zellen erfolgte mittels Digitonin (36). Zu einer 0,25 M NaCl-Lösung wurden 25 µg/ml Digitonin gegeben. Die Lösung wurde auf 37° C vorgewärmt. In diese Lösung wurden gewaschene M. pneumoniae-Zellen gegeben (jeweils 20-25 mg Mycoplasma-Protein je 200 ml Digitonin-Lösung). Es folgte eine Inkubation bei 37° C im Wasserbad. Anschließend wurde die opaleszierende Suspension bei 38 000 x g für 1 h auf einer MSE-Highspeed-Zentrifuge zentrifugiert. Das weiße Sediment wurde 10 x alternierend in Beta-Puffer (1:20 verdünnt) und Aqua dest. gewaschen. Schließlich wurde das Sediment in 50 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Der Proteingehalt wurde nach LOWRY bestimmt (28).

7. Reinigung von Membranproteinen

Lipide wurden aus den Membranen entfernt durch doppelte Extraktion mit wässrigem Aceton (33).

Zu 1 Volumen Membransuspension (Proteingehalt: 10 mg/ml) wurden 9 Volumina Aceton gegben.

Pro 50 ml wäßrigem Acetongemisch wurde 1 Tropfen 28%ige Ammoniaklösung hinzugefügt. Die Extraktion wurde unter Rühren bei Raumtemperatur über 30 min durchgeführt. Anschließend sedimentierte man die Suspension durch Zentrifugation bei 25 000 x g für 30 min. Es folgte eine Wiederholung der beschriebenen Extraktion. Anschließend wurde das Sediment, das die Membranproteine enthielt, in 40 ml Aqua dest. resuspendiert.

8. Immunisieren von Kaninchen

Antiseren gegen Membranproteine von Mycoplasma pneumoniae, Stamm FH wurden durch Immunisierung von ca. 3 kg schweren, weiblichen weißen Neuseeländer-Kaninchen mit 0,5 mg Protein / kg Körpergewicht je Injektion erzeugt. Folgendes Immunisierungsschema wurde eingehalten:

1. Injektion intracutan, Antigen + komplettes Freund´sches Adjuvans
2. Injektion nach 3 Wochen, intracutan, Antigen + inkomplettes Freund´sches Adjuvans
3. Injektion nach weiteren 3 Wochen, intraperitoneal, Antigen alleine

Die Seren wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20° C gelagert.

9. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Zur Bestimmung der immunologischen Aktiviät der benutzten Kaninchenseren gegen Mycoplasma pneumoniae wurde die Komplementbindungsreaktion benutzt. Alle Reagenzien (Hammelerythrozyten, M. pneumoniae-Antigen, Komplement, Kontrollseren) stammten von der Fa. Behring. Die Antiseren wurden in Zweierverdünnungsstufen eingesetzt. Der Ansatz aus Antiserum, Antigen und Komplement wurde über Nacht bei 4° C stehengelassen, es folgte eine halbstündige Inkubation bei 37° C im Brutschrank. Nach Zugabe des hämolytischen Systems wurde erneut bei 37° C für 30 min inkubiert. Nach einer weiteren halbstündigen Inkubation bei Zimmertemperatur fand die Ablesung statt. Als positive Kontrolle wurde ein hochtitriges Patientenserum mitgeführt. Eine Kontrolle auf antikomplementäre Aktivität (Negativ-Kontrolle) erfolgte, indem in einem weiteren Versuchsansatz die Antigenzugabe unterblieb.

10. Behandlung von Membranen mit Triton X-100

Zu 19,8 ml Membransuspension wurden 0,2 ml Triton X-100 (Fa. Serva) hinzugefügt. Nach einigen Minuten Rühren bei Raumtemperatur war das Detergenz vollständig gelöst. Es folgte eine Ultraschallbehandlung in einem MSE-Ultraschallgenerator bei maximalem Output über eine Minute im Eisbad mit Unter-

brechungen, um eine übermäßige Erwärmung zu vermeiden. Es schloß sich eine Ultrazentrifugation bei 100 000 x g über eine Stunde an (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor SW 50, 32 000 U/min). In dem detergenzhaltigen Überstand wurde nach einer modifizierten LOWRY-Methode (42 / Beschreibung siehe unten) der Proteingehalt bestimmt. Die Lösung wurde mittels Druckdialyse (Amicon Diaflo PM 10 Membran) auf einen Proteingehalt von ca. 3 mg/ml eingestellt.

11. Proteinbestimmung in Triton-haltigen Lösungen

Die Proteinbestimmung in Lösungen, die Triton X-100 enthalten, bietet Schwierigkeiten. Das Detergenz hat eine hohe Absorption bei 280 nm und stört bei kolorimetrischen Messungen. Bei der Proteinbestimmung nach LOWRY bildet das Detergenz mit dem Phenolreagenz Präzipitate. WANG und SMITH (1974) konnten das Entstehen von Präzipitaten durch den Zusatz einer 10%igen SDS-Lösung zu den Ansätzen vor dem Hinzufügen des Phenolreagenz verhindern. Sie verwendeten als Komplexbildner für die Kupferionen statt Tartrat EDTA. In eigenen Versuchen konnten wir sicherstellen, daß die Modifikation von WANG und SMITH auch bei Verwendung der klassischen LOWRY-Reagenzien brauchbar war. Auch die als Standard verwendete BSA-Lösung enthielt Triton X-100.

12. Gekreuzte Immunelektrophorese

Für die gekreuzte Immunelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit der Immunokit der Fa. LKB verwendet. Die Trägergelmatrix bestand in allen Versuchen aus einer 1%igen Suspension von Agarose (Fa. Behring) in Puffer nach SVENDSEN (3) mit 1% Triton X-100. Die Pufferreservoire enthielten Puffer ohne Detergenz. Ebenso enthielten die Gele, auf denen wasserlösliche Proteine untersucht wurden, kein Detergenz. Zur Herstellung von Gelen wurden 8,4 x 9,4 cm messende Glasplatten mit 14 ml heißer Agarose-Suspension bedeckt. Nach dem Erstarren wurden mit einer Schablone an der Kathodenseite der Glasplatte drei Antigen-Depotlöcher mit einem Fassungsvermögen von 8 µl gestanzt. In diese Löcher wurden jeweils 8 µl einer Antigen-Lösung eingebracht. Es folgte die erste Dimension der Elektrophorese (Dauer 2 1/2 h, Feldstärke 10 V/cm). Aus dem Gel wurden anschließend mit einer Schablone 3 Streifen herausgeschnitten, die den Laufstrecken der Antigene entsprachen. Das restliche Gel wurde verworfen. Jeder Gelstreifen wurde mit einer Rasiermesserklinge auf die Kathodenseite einer frischen Glasplatte übertragen. Zu frischer Agarose-Suspension mit einer Temperatur von 56° C wurden 10 Vol% Antiserum gegeben und 10 ml der Mischung rasch auf den noch unbedeckten Teil der Glasplatte gegossen. Es schloß sich die zweite Dimension der Elektrophorese rechtwinklig zur ersten an.

Die Dauer betrug 20 h und die Feldstärke 2 V/cm. An diese Elektrophorese schlossen sich Arbeitsgänge an, die zum Ziel hatten, möglichst viel nicht präzipitiertes Protein aus dem Gel zu entfernen. Zunächst wurde dem Gel durch zwanzigminütiges Pressen mit Filterpapier Flüssigkeit entzogen. Es folgten zwei Waschvorgänge in physiologischer Kochsalzlösung über je 20 Minuten. Daran schloß sich ein gleichlanger Waschvorgang mit Aqua dest. an. Hiernach wurde das Gel erneut gepreßt. Zuletzt wurde das Gel unter einem handwarmen Luftstrom zu einem dünnen Film getrocknet. Die Färbung wurde durchgeführt mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fa. Serva), gelöst in einem Gemisch aus 450 ml 96%igem Äthanol, 450 ml Aqua dest. und 100 ml Eisessig. Entfärbt wurde mit dem Lösungsmittel.

13. Tandem-Immunelektrophorese

Die Tandem-Immunelektrophorese erlaubt den direkten immunologischen Vergleich zweier Antigengemische (3). Ihr Prinzip besteht darin, zwei Antigengemische in der ersten Dimension auf einer Laufstrecke aufzutrennen.

In das Gel für die erste Dimension wurden zwei Depotlöcher hintereinander eingestanzt. In jedes Loch wurde ein Antigengemisch eingefüllt. Man erlaubte den Lösungen, in das Gel zu diffundieren, was ungefähr eine halbe Stunde in Anspruch nahm. Danach wurden die Löcher mit einem Tropfen war-

mer Agarose-Suspension verschlossen (Temperatur ca. 50° C, um eine Hitzedenaturierung der Proteine zu vermeiden). Es schloß sich die Elektrophorese in der ersten Dimension an, die wie alle weiteren Schritte völlig dem Verfahren bei der einfachen gekreuzten Immunelektrophorese entsprach.

Die Ablesung ähnelt dem Antigenvergleich in der Doppel-Immundiffusion nach Ouchterlony. Eine Fusion der Präzipitatlinien bedeutet Identität, Spornbildung zeigt Verschiedenheit an. Bei einigen Gelen wurde in der zweiten Dimension ein antikörperfreies Zwischengel von 2 cm Breite eingefügt, um eine bessere Ausbildung von Präzipitatbögen zu erreichen.

14. Zwischengelelektrophorese

Die Zwischengelelektrophorese, eine weitere Variante der gekreuzten Immunelektrophorese, erlaubt den Vergleich zweier Antiseren (3).

Der erste Lauf unterschied sich nicht von der einfachen gekreuzten Immunelektrophorese. Für den zweiten Lauf wurde vor dem Antigenstreifen mit einer Glasplatte ein 2 cm breiter Raum abgegrenzt. In diesen wurden 2,7 ml Agarose-Suspension, die das Antiserum 1 enthielten, gegossen. Nach dem Erstarren wurde die abgegrenzende Glasplatte mit einem Federmesser freigeschnitten und entfernt. Der restliche Teil der Glasplatte für die Immunelektrophorese wurde mit 7,3 ml Agarose-Suspension,

die das Antiserum 2 enthielten, bedeckt. Die weitere Prozedur entsprach der einfachen gekreuzten Immunelektrophorese.

Die Abbildung 2 erläutert das Prinzip der Zwischengelelektrophorese.

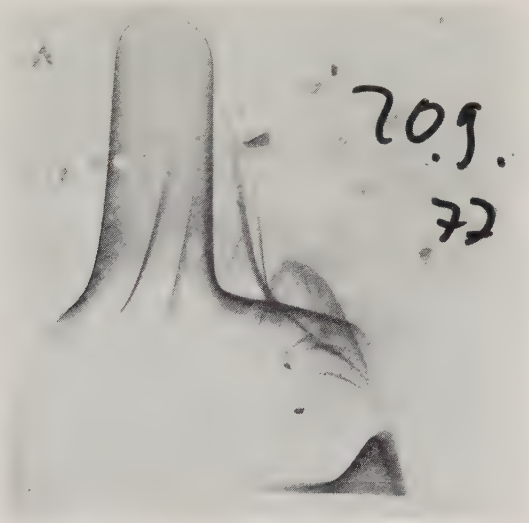

Abb. 2 Zwischengelelektrophorese. Antigen war Humanserum. Antiserum 1 war ein monospezifisches Antiserum gegen humanes IgG. Antiserum 2 war ein polyvalentes Anti-Humanserum. Durch die Zwischenschaltung des Gels mit dem Antiserum 1 wurde ein Präzipitat aus dem Präzipitatmuster des Humanserums "herausgeholt". Durch Weglassen des Antiserums in Gel 1 oder Gel 2 läßt sich im Vergleich feststellen, welche Antigenspezifitäten zwei Antiseren gemeinsam haben.

15. Agarosegelelektrophorese

Hierfür wurde nur der erste Schritt der gekreuzten Immunelektrophorese durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele fixiert durch Einlegen in folgende Lösung:

Pikrinsäure	14 g
Aqua dest.	1000 ml
Eisessig	200 ml

Die Pikrinsäure wurde zu dem destillierten Wasser gegeben und sanft auf 60° C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung durch ein Papierfilter von ungelösten Bestandteilen befreit und zum Schluß der Eisessig hinzugefügt. Fixiert wurde über eine Zeit von 10 Minuten, anschließend wurde das Gel 5-10 Minuten in 96%igem Alkohol gewaschen (3). Zum Trocknen und Färben wurde dasselbe Verfahren angewandt wie bei den gekreuzten Immunelektrophoresen.

16. Doppel-Immundiffusion (Ouchterlony-Test)

Diese Methode wurde benutzt, um Nullseren von Kaninchen auf "natürliche" Präzipitine gegen Pferdeserum bzw. gegen Mycoplasma pneumoniae-Membranen zu untersuchen.

8,4 x 9,4 cm messende Glasplatten wurden mit 14 ml folgender Agarose-Suspension bedeckt (46):

0,025 M Barbital/HCl-Puffer, pH 8,6

0,8% Agarose (Fa. Behring)

Bei Versuchen mit Mycoplasma pneumoniae-Membranen wurde der Suspension 1% Triton X-100 zugesetzt.

Mit einer Schablone wurden Rosetten von Depotlöchern mit einem Fassungsvermögen von 8 µl in das Gel gestanzt. Um ein zentrales Depotloch gruppierten sich sechs periphere Depotlöcher. In das Zentralloch wurde das jeweilige Antigengemisch eingefüllt, in die peripheren Löcher die zu untersuchenden Antiseren. Die Untersuchungen erfolgten im Checkerboard-System, wobei Antiseren und Antigene in Zweier-Verdünnungsstufen eingesetzt wurden. Jede Rosette erhielt eine Pufferkontrolle und als Positiv-Kontrolle jeweils entweder Anti-Pferdeserumprotein (Fa. Medac) oder Antiserum gegen Membranproteine von Mycoplasma pneumoniae. Die Diffusion erfolgte bei 37° C in der feuchten Kammer. Ablesungen wurden in zwölfstündigen Abständen durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Agarosegelelektrophorese

Ziel dieser Experimente war es, herauszufinden, welche Aufbereitung des Membranmaterials von Mycoplasma pneumoniae geeignet war, eine möglichst große Menge Antigenmaterials zur Wanderung in das Elektrophoresegel zu bringen. Untersucht wurden unbehandelte Membranen, eine ultraschallbehandelte Membransuspension und eine Triton X-100 lösliche, aufkonzentrierte Membranfraktion. Einen deutlichen Fortschritt hinsichtlich der Menge des gewanderten Proteins stellte bereits die ultraschallbehandelte Membransuspension dar. Das meiste Protein konnte mit der aufkonzentrierten Triton X-100 löslichen Membranfraktion in das Gel gebracht werden (Abb. 3). In keinem Fall erfolgte eine Auftrennung des Proteinmaterials in Banden.

Abb. 3 Agarosegelelektrophorese der aufkonzentrierten Triton X-100 löslichen Membranfraktion. Laufrichtung von links nach rechts. Es erfolgte keine Auftrennung in Banden.

2. Gekreuzte Immunelektrophorese mit Humanserum

Zur Überprüfung des benutzten Gel-Puffer-Systems wurde Humanserum gegen polyvalentes Anti-Humanserum präzipitiert. Es ließen sich ca. 20 scharfe Präzipitatbögen unterscheiden. Dies zeigte das gute Auflösungsvermögen der Methode.

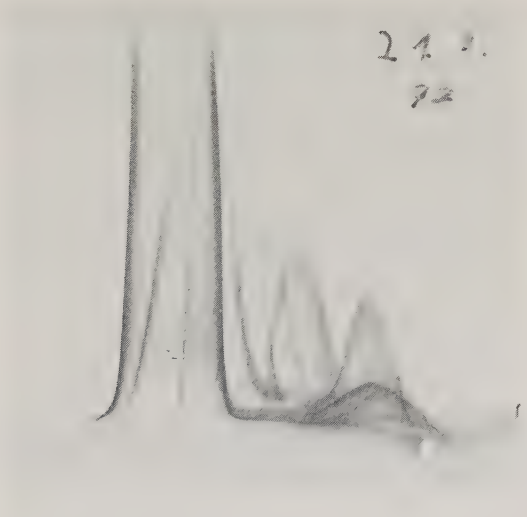

Abb. 4 Gekreuzte Immunelektrophorese von Humanserum gegen polyvalentes Anti-Humanserum. Laufrichtung von rechts nach links. Ca. 20 Proteine kommen deutlich zur Darstellung.

3. Komplementbindungsreaktion (KBR)

Eine KBR auf Mycoplasma pneumoniae-Antikörper, die routinemäßig für die Untersuchung von Patientenseren angewendet wird, wurde zur Überprüfung des

Immunisierungserfolges eingesetzt. Für das in den folgenden Experimenten verwendete Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine ergab sich 1 Woche nach der letzten Immunisierung ein Titer von 1 : 2048. Das kommerzielle Antiserum gegen Pferdeserum (Fa. Medac) zeigte in dem gleichen Test einen Titer von 1 : 64. Dieser positive Titer ist durch Kontamination der bei dem Test als Antigen verwendeten M. pneumoniae-Organismen durch Pferdeserum, das bei der Züchtung verwendet wird, leicht zu erklären.

4. Antigenvergleich der Membranen eines avirulenten und eines virulenten Stammes von M. pneumoniae

4.1. gekreuzte Immunelektrophorese

In der gekreuzten Immunelektrophorese zeigte der FH-Stamm, der auch in allen weiteren Experimenten benutzt wurde, mit dem Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine 3 Präzipitate, die im folgenden mit I, II, und III bezeichnet werden (Abb. 5.a.). Zusätzlich wurde bei diesem Experiment neben dem avirulenten FH-Stamm auch der virulente PI-Stamm untersucht. Es sollte überprüft werden, ob die Virulenz des PI-Stammes mit einem andersartigen Antigenmuster seiner Membran verbunden ist. Es konnten keine morphologischen Unterschiede im Antigenmuster des avirulenten und des virulenten Stammes gefunden werden (Abb. 5.b.).

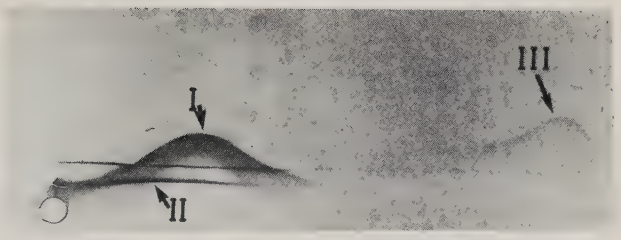

Abb. 5.a. Gekreuzte Immunelektrophorese der Triton-löslichen Membranfraktion des FH-Stammes gegen Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine. Laufrichtung von links nach rechts. 3 Präzipitate sind unterscheidbar. Die Präzipitate bilden sich in der gekreuzten Immunelektrophorese stets bereits vor dem antikörperhaltigen Gelabschnitt aus, da während des zweiten Elektrophoreseschrittes Gamma-Globuline in den ursprünglich antikörperfreien Bereich diffundieren und bereits dort zur Präzipitation führen.

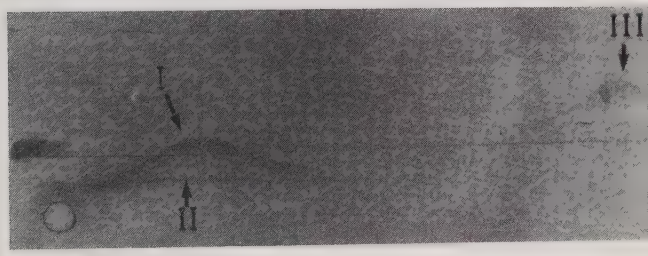

Abb. 5.b. Die gleiche Untersuchung am PI-Stamm. Die 3 Präzipitate entsprechen morphlogisch denen des FH-Stammes.

4.2. Tandem-Immunelektrophorese

In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob der morphologischen Ähnlichkeit des Antigenmusters des avirulenten und des virulenten Stammes von Mycoplasma pneumoniae auch eine immunologische Identität entspricht. Wie Abb. 6.a. und b. zeigen, sind alle Präzipitate immunologisch identisch. Mit unserer Methode ließ sich also keine mit der Virulenz korrelierende Änderung im Proteinmuster der Membran von Mycoplasma pneumoniae darstellen.

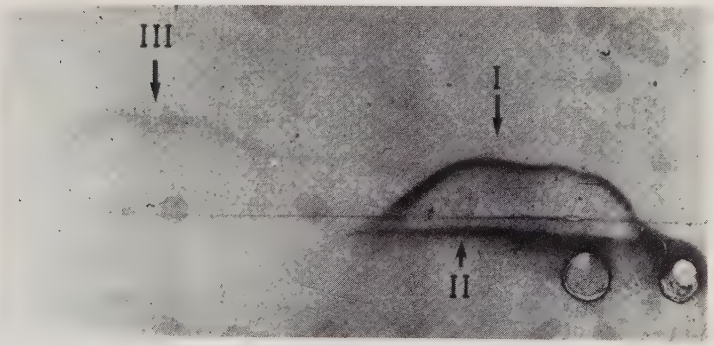

Abb. 6.a. Tandem-Immunelektrophorese der Membranantigene des FH-Stammes (rechtes Depot) und des PI-Stammes (linkes Depot) gegen Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine. Laufrichtung von rechts nach links. Die Fusion der Präzipitate I und III ist gut zu erkennen. Es zeigt sich keine Spornbildung, die analog zum Antigenvergleich im Ouchterlony-Test auf immunologische Unterschiede hinweisen würde.

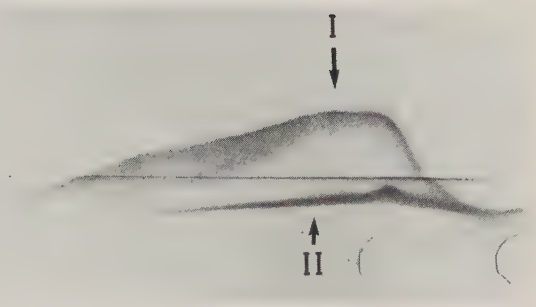

Abb. 6.b. Die Abbildung zeigt den Bereich der Präzipitate I und II aus einer anderen Elektrophoreseplatte als in Abb. 6.a.. Der Versuchsansatz war der gleiche wie bei Abb. 6.a.. Hierbei ist deutlich erkennbar, daß auch das Präzipitat II bei avirulentem und virulentem Stamm identisch ist.

5. Nachweis von Pferdeserumantigen in den Membranpräparationen

5.1. Zwischengelelektrophorese

Mit der Zwischengelelektrophorese können zwei Antiseren in ihren Reaktionen mit einem Antigengemisch verglichen werden. Es sollte in diesem Experiment die Frage geklärt werden, ob ein kommerzielles Antiserum gegen Pferdeserum mit Antigenen der Mycoplasmamembran reagiert und ob diese Antigene in den drei Präzipitationslinien enthalten sind, die das Antiserum gegen Membranproteine mit der Triton-

löslichen Membranfraktion erzeugte. Dazu wurden drei Zwischengelelektrophoresen durchgeführt. Im Falle der Abb. 7.a. enthielt das Zwischengel kein Antiserum. Das obere Gel enthielt wie bei den Abb. 5. und 6. das Antiserum gegen die Membranproteine von Mycoplasma pneumoniae. Man erkennt die 3 Präzipitate der vorherigen Abbildungen wieder. Sie haben sich in einem höher gelegenen Teil der Elektrophoreseplatte ausgebildet als in den Abb. 5. und 6.. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Antigene bei ihrer Wanderung in das Gel zunächst noch keine spezifischen präzipitierenden Antikörper antrafen.

Abb. 7.a. Zwischengelelektrophorese der Triton-löslichen Membranfraktion. Laufrichtung von links nach rechts. Das Zwischengel enthielt kein Antiserum. Die Präzipitation erfolgte in einem relativ hoch gelegenen Bereich. Der obere Teil der Platte, der keine Präzipitate enthielt, ist hier wie auch in den Abb. 7.b. und 7.c. nicht mitphotographiert.

Im Falle der Abb. 7.b. enthielt das Zwischengel nun Antiserum gegen Pferdeserumproteine. Das obere Gel enthielt wie in Abb. 7.a. das Antiserum gegen Membranproteine. Wenn das Antiserum gegen Pferdeserumproteine nicht mit den Antigenen der Triton-löslichen Membranfraktion reagiert hätte, hätte sich ein Bild wie in Abb. 7.a. ergeben müssen. Die Präzipitate liegen diesmal jedoch tiefer. Zusätzliche Präzipitate sind nicht erkennbar. Dies bedeutet erstens, daß die Präzipitate mit denen des vorigen Experimentes identisch sind, und zweitens, daß das Zwischengel Antikörper gegen die drei Membrankomponenten enthalten haben muß. Alle drei Membrankomponenten reagieren also mit Anti-Pferdeserumprotein.

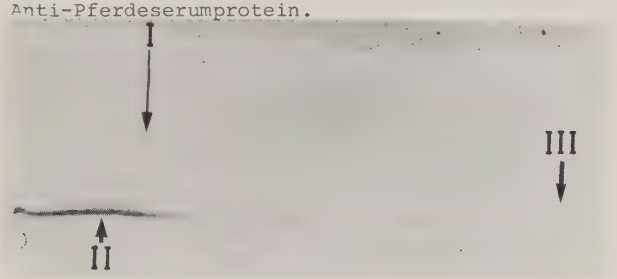

Abb. 7.b. Zwischengelelektrophorese der Triton-löslichen Membranfraktionen. Laufrichtung von links nach rechts. Das Zwischengel enthielt Antiserum gegen Pferdeserum-protein. Die Präzipitation begann bereits wenig oberhalb des Antigendepots.

Im Falle der Abb. 7.c. enthielt das Zwischengel wieder Anti-Pferdeserumprotein. Das obere Gel enthielt kein Antiserum. Wie nach Abb. 7.b. zu erwarten,

reagierte das Anti-Pferdeserumprotein mit allen 3 Membrankomponenten. Die Aktivität gegen das Präzipitat I war am niedrigsten. Das Präzipitat war nur schwach sichtbar.

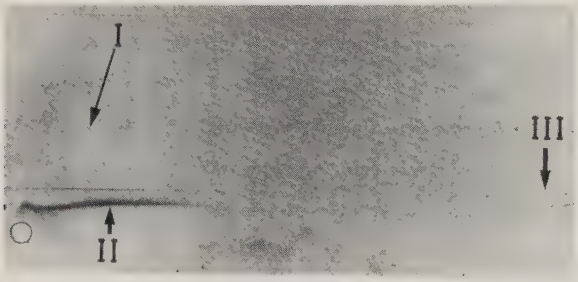

Abb. 7.c. Zwischengelelektrophorese der Triton-löslichen Membranfraktion. Laufrichtung von links nach rechts. Im Zwischengel befand sich Anti-Pferdeserumprotein Das obere Gel war antiserumfrei. Das Präzipitat I ist nur schwach sichtbar.

5.2. Gekreuzte Immunelektrophorese mit Pferdeserum als Antigen

Aufgrund der Befunde aus 5.1. stand zu erwarten, daß Kaninchen, die mit Membranprotein von auf Pferdeserum enthaltenden Nährmedien gezüchteten M. pneumoniae-Organismen immunisiert worden waren, Antikörper gegen Komponenten des Pferdeserums bildeten. Wir führten deshalb eine gekreuzte Immunelektrophorese mit Pferdeserum als Antigen gegen das Antiserum gegen die Mycoplasma pneumoniae-Membranproteine durch. Die Abb. 8. zeigt, daß gegen mindestens 5 Komponenten des Pferdeserums

Antikörper gebildet worden sind.

Abb. 8. Immunelektrophorese von Pferdeserum gegen Anti-M. pneumoniae-Membranprotein. Laufrichtung von links nach rechts. Mindestens 5 Präzipitate können unterschieden werden.

6. Untersuchungen an den Überständen nach Waschen der Membranen

Die Überstände, die beim Waschen der Membranen angefallen waren, waren gepoolt und aufkonzentriert worden. Die Tatsache, daß trotz des fünfmaligen Waschens der Organismen und trotz des anschließenden zehnmaligen Waschens der Membranen noch Mediumbestandteile im Antigenmaterial zurückgeblieben waren, gab Anlaß zur Untersuchung dieser Überstände in der gekreuzten Immunelektrophorese.

6.1. Gekreuzte Immunelektrophorese gegen Antiserum gegen Mycoplasma pneumoniae-Membranproteine

Die Abb. 9.a. zeigt als Ergebnis dieses Experimentes 5 Präzipitatlinien. Es muß daraus geschlossen werden, daß diese Antigene zwar während der Waschvorgänge abgelöst wurden, aber die Membranen nicht so vollständig von ihnen gereinigt werden konnten, daß eine Immunisierung der Kaninchen unterblieb.

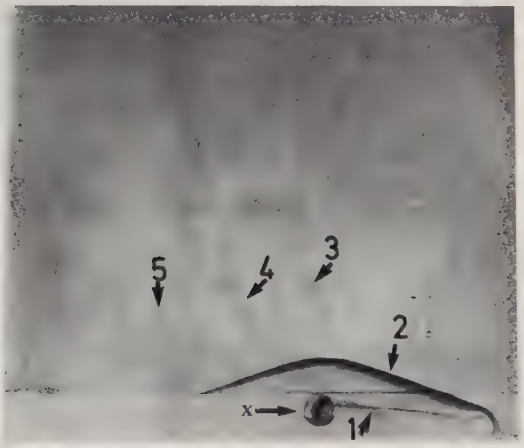

Abb. 9.a. Gekreuzte Immunelektrophorese des Konzentrats der Waschungsüberstände mit dem Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine. Laufrichtung von rechts nach links. 5 Präzipitate sind unterscheidbar. Bei der mit X bezeichneten Struktur handelt es sich um ein Artefakt.

6.2. Gekreuzte Immunelektrophorese gegen Anti-Pferdeserumprotein

Die gekreuzte Immunelektrophorese des Konzentrats der Waschungsüberstände gegen das kommerzielle Antiserum gegen Pferdeserumproteine ergab den Nachweis von ca. 13 Antigenen des Pferdeserums. Daraus ist zu schließen, daß es durch die Waschungen der Membranen möglich ist, wenigstens einige verunreinigende Proteine in einem für immunologische Untersuchungen ausreichenden Maße von der Membran zu entfernen.

Abb. 9.b. Gekreuzte Immunelektrophorese des Konzentrats der Waschungsüberstände gegen Anti-Pferdeserumprotein. Laufrichtung von links nach rechts. 13 Präzipitatlinien sind unterscheidbar.

6.3. Tandem-Immunelektrophorese

Ziel dieses Experimentes war es, zu klären, ob die Antigene, die sich in der Triton-löslichen Membranfraktion nachweisen ließen, identisch waren mit Antigenen, die sich im Konzentrat der Waschflüssigkeiten befanden. Die Abb. 9.c. zeigt das Ergebnis einer Tandem-Immunelektrophorese mit der Triton-löslichen Membranfraktion und dem Konzentrat der Waschflüssigkeiten gegen das Antiserum gegen die M. pneumoniae-Membranproteine. Es war in diesem Experiment ein antiserumfreies Zwischengel eingefügt worden, um eine bessere Ausbildung der Präzipitatbögen zu erzielen. Präzipitatlinien, die zum Konzentrat der Waschungsüberstände gehören, sind mit arabischen Ziffern bezeichnet, solche der Membranfraktion mit römischen. Es kommen drei Antigene der Waschungsüberstände und zwei der Membranfraktion zur Darstellung. Für das Präzipitat I kann mit Sicherheit ausgesagt werden, daß es sich nicht in den Überständen befindet. Im Falle des Präzipitates II kann diese Aussage nicht gemacht werden, da sich in seinem Bereich in den Waschungsüberständen inkonstant auch ein Präzipitat fand (Präzipitat 1 in Abb. 9.a.).

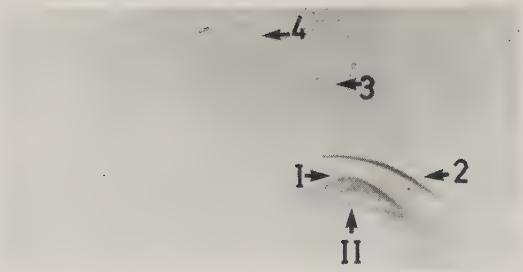

Abb. 9.c. Tandem-Immunelektrophorese des Konzentrats der Waschflüssigkeiten (Antigendepot befand sich außen) und der Triton-löslichen Membranfraktion (Antigendepot war weiter innen gelegen). Die Antigendepots sind nicht abgebildet. Laufrichtung von rechts nach links. Keine Fusion der Präzipitate der Membranfraktion mit denen der Waschungsüberständen ist erkennbar.

7. Doppel-Immundiffusion (Ouchterlony-Test)

Um sicherzustellen, daß die Aktivität gegen Pferdeserumproteine in dem Antiserum gegen M. pneumoniae-Membranproteine auch wirklich auf die Immunisierung mit der Membranproteinfraktion zurückzuführen war, wurden die Nullseren der immunisierten Kaninchen in einem Ouchterlony-Test gegen Pferdeserum ein-

gesetzt. Dieser Test ist wesentlich einfacher und empfindlicher als die gekreuzte Immunelektrophorese. Keines der Nullseren reagierte mit Pferdeserum.

In einem weiteren Testansatz wurden die Nullseren von 8 stichprobenartig ausgewählten Kaninchen gegen die Triton-lösliche Membranfraktion von Mycoplasma pneumoniae eingesetzt. Keines der Seren zeigte eine positive Reaktion mit der Membranfraktion. Da das Nullserum des kommerziellen Anti-Pferdeserumproteins nicht zur Verfügung stand, war auf diese Weise die Aussage möglich, daß die Reaktion dieses Antiserums mit der Membranfraktion mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf präexistierende "natürliche" Antikörper gegen M. pneumoniae zurückzuführen war.

V. D I S K U S S I O N

In zahlreichen Arbeiten ist dokumentiert, daß Proteine aus dem Wachstumsmedium in Mycoplasmen nachweisbar sind und daß Versuchstiere, die mit diesen Organismen immunisiert wurden, Antikörper gegen Mediumproteine bilden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte ein Antiserum, das durch Immunisierung mit M. pneumoniae-Membranproteinen in Kaninchen erzeugt worden war, mit Pferdeserum 5 Präzipitate in der gekreuzten Immunelektrophorese. Ein kommerzielles Antiserum gegen Pferdeserumproteine reagierte mit der Bildung von 3 Präzipitaten gegen eine Triton-lösliche Membranfraktion von Mycoplasma pneumoniae. Die Membranen waren vor ihrer Verwendung für die Immunisierung beziehungsweise vor der Lösung in Triton X-100 10 x abwechselnd in Beta-Puffer und Aqua dest. gewaschen worden. Die für die Membranbereitung benutzten Organismen waren 5 x in Veronal-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen worden. Insgesamt 15 Waschvorgänge ermöglichten also nicht, alle Pferdeserumbestandteile aus der Membran zu entfernen. Die Tatsache, daß sich in den gepoolten Überständen aus den Membranwaschungen noch zahlreiche weitere Pferdeserumantigene nachweisen liessen, zeigt andererseits, daß es möglich ist, durch intensives Waschen etliches kontaminierendes Material noch zu entfernen. Das Antiserum gegen

Membranproteine von Mycoplasma pneumoniae reagierte mit 5 in den gepoolten Waschungsüberständen befindlichen Antigenen. Ob es sich bei allen diesen Antigenen um Pferdeserumproteine handelte, ist nicht untersucht worden. Interessant ist jedoch, daß sich in den gepoolten Überständen kein Antigen nachweisen ließ, das mit dem Präzipitat I der Triton-löslichen Membranfraktion kreuzreagierte (siehe Abb. 9.c.). Offenbar wurde sämtliches ablösbare Pferdeserumprotein dieses Typs bereits durch die 5 Waschungen der Organismen entfernt. Das restliche Protein aber war so fest an die Membran gebunden, daß bei weiteren Waschungen keine nachweisbaren Mengen mehr abgelöst werden konnten.

In den meisten Arbeiten, die über die Adsorption von Mediumantigenen an Mycoplasmen berichten, ist keine so intensive Waschung des Antigenmaterials durchgeführt worden. CLARK et al. (1969) sowie BALL und TODD (1978) und YAGUZHINSKAYA (1977) wuschen 2 bzw. 3 x in physiologischer Kochsalzlösung. Die meisten Autoren wuschen 2-4 x in PBS WILLIAMS et al. (1970), BRADBURY und JORDAN (1972), MASOVER et al. (1975), HANSEN et al. (1979) . KENNY (1969) wusch 3 x in TES-Saline, HOLLINGDALE und LEMCKE (1972) 6 x in Tris-Saline. JORDAN und KULASEGARAM (1968) konnten noch nach der 12. Waschung in PBS Medium-

antigene auf Mycoplasma gallisepticum nachweisen. WROBLEVSKY und RATANASAVANH (1976) hingegen geben an, bei Immunisierungen mit Acholeplasma laidlawii, Acholeplasma granularum und Mycoplasma fermentans bei zweimaligem Waschen mit Beta-Puffer keine Antikörper gegen Mediumbestandteile gefunden zu haben.

BREDT (1976 a. und b.) hat auf die pathogenetische Bedeutung der Adsorption von Fremdantigenen an Mycoplasmen hingewiesen. Adsorbierte Wirtsantigene ermöglichen den Erregern eventuell eine immunologische Tarnung. Auf der anderen Seite ist es aber auch denkbar, daß durch den Einbau solcher Wirtsproteine in die Membran eines Krankheitserregers diese Proteine für den Wirt immunogen werden. Dies böte einen möglichen Ansatz für das Verständnis der vielfältigen Autoimmunphänomene, die im Zusammenhang mit einer Mycoplasmenpneumonie beschrieben worden sind.

Die feste Bindung von Mediumantigenen an Mycoplasmen könnte möglicherweise einen Erklärungsansatz für die manchmal schlechten Erfolge von Impfungen mit abgetöteten Erregern bieten. Die Fähigkeit des Organismus, auf eine Vielzahl von Antigenen gleichzeitig zu reagieren, ist nämlich begrenzt. Schon MICHAELIS (1902) fand bei der Immunisierung von Kaninchen mit Fremdseren, daß Antikörper nur gegen Globuline nicht aber gleichzeitig gegen Albumin gebildet worden waren.

Es wäre also denkbar, daß adsorbierte Mediumantigene eine ausreichende Immunisierung gegen genuine Erregerantigene verhindern.

Die Immunisierung mit Mycoplasma pneumoniae-Membranproteinen hat bei unseren Experimenten jedoch offenbar auch in einem gewissen Maße zur Bildung von Antikörpern gegen echte Mycoplasmenantigene geführt. Der im Vergleich zu dem Anti-Pferdeserumprotein hohe Titer von 1 : 2048 in der KBR auf Mycoplasma pneumoniae läßt keinen anderen Schluß zu. Das Anti-Pferdeserumprotein besaß in dieser Untersuchung einen Titer von 1 : 64.

Die Lösung der Mycoplasmenmembranen in Triton X-100 ergab keine Auftrennung in einzelne Banden in der Agarosegelelektrophorese. Dies deutet darauf-hin, daß es nicht möglich ist, Mycoplasmenmembranen mit diesem Detergenz in ihre molekularen Bestandteile zu zerlegen. Dieser Befund deckt sich mit Angaben von NE´EMAN et al. (1972) zu Versuchen mit Acholeplasma laidlawii, daß nichtionische Detergenzien die Membran nicht vollständig zerlegen können und Proteinaggregate und bisweilen sogar Lipoproteinpartikel intakt lassen.
Als Alternative zu Triton X-100 böte sich zum Beispiel Natriumdesoxycholat an, das in den Versuchen von NE´EMAN et al.(1972) excellente Trenneigenschaften zeigte und von WROBLEVSKY und RATANASAVANH (1976) bereits in der gekreuzten Immunelektrophorese von Mycoplasmen eingesetzt worden ist.

Die Tandem-Immunelektrophorese des avirulenten FH-Stammes mit dem virulenten PI-Stamm ergab keinen immunologischen Unterschied in der Proteinstruktur der Membranen. LIPMAN et al. (1969) fanden in der KBR, im MI-Test und im Ouchterlony-Test ebenfalls keine immunologischen Unterschiede zwischen avirulenten und virulenten Mycoplasma pneumoniae-Stämmen. Befunde über Unterschiede im Proteinmuster von virulenten und attenuierten, beziehungsweise avirulenten, Stämmen von Mycoplasma pneumoniae sind bisher mittels Gradienten-Polyacrylamidgel-Elektrophorese GABRIDGE et al. (1976) und einer zweidimensionalen Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese HANSEN et al. (1979) erhoben worden. Beide Methoden haben eine erheblich höhere Auflösung als die gekreuzte Immunelektrophorese.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adsorption von Antigenen aus dem Nährmedium durch Mycoplasma pneumoniae mit Hilfe der gekreuzten Immunelektrophorese untersucht. Auf flüssigen Nährmedien, die Pferdeserum enthielten, wurden Organismem gezüchtet, daraus Membranfraktionen isoliert und in Kaninchen Hyperimmunseren gegen Membranproteine erzeugt. Untersucht wurden in der gekreuzten Immunelektrophorese Membranen von einem avirulenten und einem virulenten Satmm. Dafür waren die Membranen in Triton X-100 gelöst worden. Es ließen sich drei Präzipitatlinien darstellen. Kein Unterschied konnte zwischen dem avirulenten und dem virulenten Stamm festgestellt werden. In allen drei Präzipitatlinien konnten Pferdeserumproteine festgestellt werden. Das erzeugte Antiserum reagierte mit fünf Komponenten des Pferdeserums. Es wurde geschlossen, daß sich auch durch intensives Waschen nicht alle Pferdeserumbestandteile von den Mycoplasmen entfernen lassen. Andererseits zeigten Untersuchungen an einem Konzentrat der Waschflüssigkeiten aus den Membranwaschungen, daß es möglich ist, durch intensives Waschen noch zahlreiche kontaminierende Proteine aus den Membranen zu entfernen. Die Agarosegelelektrophorese von in Detergenz gelösten Membranen ergab keine Auftrennung in Banden. Es wurde daraus geschlossen, daß das Detergenz Triton X-100

Mycoplasmenmembranen nicht vollständig in ihre molekularen Bestandteile zerlegen kann.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALEXANDER, A.G., and G.E. KENNY :
Characterization of membrane and cytoplasmic antigens of Mycoplasma arginini by two-dimensional (crossed) immunoelectrophoresis
Infect. Immun. 15, 313-321, 1977

2. ALEXANDER, A.G., and G.E. KENNY :
Application of charge-shift electrophoresis to antigenic analysis of mycoplasmic membranes by two-dimensional (crossed) immunoelectrophoresis
Infect. Immun. 20, 861-863, 1978

3. AXELSEN, N.H., J. KRØLL, and B. WEEKE (Hrsg.) :
A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis Methods and Applications
Universitetforlaget Oslo, 4. Aufl., 1975

4. BALL, H.J., and D. TODD :
Comparison of antigens of pneumonia associated mycoplasma species by gel diffusion
Infect. Immun. 21, 954-958, 1978

5. BRADBURY, J.M., and F.T.W. JORDAN :
The absorption of gamma globulins to Mycoplasma gallisepticum and the possible role in non-specific serological reactions
Vet. Rec. 89, 318, 1971

6. BRADBURY, J.M., and F.T.W. JORDAN :
Studies on the absorption of certain medium proteins to Mycoplasma gallisepticum and their influence on agglutination and haemagglutination reactions
J. Hyg. Cambridge 70, 267-278, 1972

7. BREDT, W. :
Pathogenic factors of mycoplasmas
Infection 4, Suppl. 1, 9-11, 1976 a

8. BREDT, W. :
Biologische Besonderheiten der Mycoplasmen in ihrer möglichen Beziehung zur Pathogenität
Zentralbl. Bacteriol. Orig. A 235, 114-121, 1976 b

9. BRUNNER, H., and R.M. CHANOCK :
A radioimmunoprecipitation test for the detection of Mycoplasma pneumoniae antibody
Proc. Soc. exp. Biol. 143, 97-105, 1975

10. BRUNNER, H. :
Die Mycoplasma-Pneumonie. Ein Modell zum Studium der Pathogenese von Infektionskrankheiten
Immun. Infekt. 7, 40-45, 1979

11. CHANOCK, R.M., L. HAYFLICK, and M.F. BARILE :
Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO
Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 41-49, 1962

12. CLARK, H.W., J.S. BAILEY, and T.Mc P. BROWN :
Variations in mycoplasma antigen activity
in: M. SPRÖSSIG und W. WITZLEB (Hrsg) :
Mycoplasma Diseases of Man
Gustav Fischer VEB Jena, 1969, pp. 45-58

13. CLARKE, H.G.M., and T. FREEMAN :
A quantitative immunoelectrophoresis method (Laurell electrophoresis)
Prot. Biol. Fluids 14, 503-509, 1966

14. DIENES, L.,and G. EDSALL :
Observations on the L-organism of Klieneberger
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 36, 740-744, 1937

15. EATON, M.D., G. MEIKLEJOHN, and W. VAN HERICK :
Studies on the etiology of primary atypical pneumonia
J. exp. Med. 79, 649-668, 1944

16. EDWARD, D.G., and E.A. FREUNDT :
The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group
J. gen. Microbiol. 14, 197-207, 1956

17. GABRIDGE, M.G., S.E. SINGER, and R.A. ESPOSITO :
Gradient polyacrylamide gel electrophoresis of proteins from cytotoxic mycoplasma membranes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 271-279, 1976

18. HAMBURGER, R.N., D.A. PIOUS, and S.E. MILLS :
Antigenic specifities aquired from the growth medium by cells in tissue culture
Immunology 6, 439-449, 1963

19. HAMBURGER, R.N., and S.E. MILLS :
Passive immune kill of cells in tissue culture
Immunology 8, 454-460, 1964

20. HANSEN, E.J., R.M. WILSON; and J.B. BASEMAN :
Two-dimensional gel elektrophoretic comparison of proteins from virulent and avirulent strains of Mycoplasma pneumoniae
Infect. Immun. 24, 468-475, 1979

21. HOLLINGDALE, M.R., and R.M. LEMCKE :
Membrane antigens of Mycoplasma hominis
J. Hyg. Cambridge 70, 85-98, 1972

22. JOHANSSON, K.E., and S. HJERTEN :
Localization of Tween-20 soluble membrane proteins of Acholeplasma laidlawii by crossed immunoelectrophoresis
J. Mol. Biol. 86, 341-348, 1974

23. JORDAN, F.T.W., and P. KULASEGARAM :
Non-specific antibodies in chickens inoculated intranasally with Mycoplasma gallisepticum
J. Comp. Pathol. 78, 407-414, 1968

24. KENNY, G.E. :
Serological comparison of ten glycolytic mycoplasma species
J. Bacteriol. 98, 1044-1055, 1969

25. KING, C.A. :
A general study on the adsorption of protein by tissue
Biochim. Biophys. Acta, 154, 269-277, 1968

26. LAURELL, C.B. :
Antigen-antibody crossed electrophoresis
Analyt. Biochem. 10, 358-361, 1965

27. LIPMAN, R.P., W.A. Clyde JR, and F.W. DENNY :
Characteristics of virulent, attenuated and avirulent Mycoplasma pneumoniae strains
J. Bacteriol. 100, 1037-1043, 1969

28. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL :
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951

29. MASOVER, G.K., R.P. MISCHAK, and L. HAYFLICK :
Some effects of growth medium composition on the antigenicity of a T-strain mycoplasma
Infect. Immun. 11, 530-539, 1975

30. MICHAELIS, L.:
Untersuchungen über Eiweißpräzipitine
Dtsch. med. Wochenschr. 28, 733-736, 1902

31. NE'EMAN, Z., I. KAHANE, J. KOVARTOVSKY, and S. RAZIN :
Characterization of the mycoplasma membrane proteins : III. Gel filtration and immunological characterization of Acholeplasma laidlawii membrane proteins
Biochim. Biophys. Acta 266, 255-268, 1972

32. NOCARD et ROUX
Le microbe de la péripneumonie
Annales de l'Institut Pasteur 12, 240-262, 1898

33. RAZIN, S., B. PRESCOTT, and R.M. CHANOCK :
Immunogenicity of Mycoplasma pneumoniae lipids: A novel approach to the production of antisera to membrane lipids
Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 590-597, 1970

34. RAZIN, S., S. ROTTEM, M. HASIN, and N.L. GERSHFELD :
Binding of exogenous proteins and lipids to mycoplasma membranes
Ann. N. Y. Acad. Sci. 225, 28-37, 1973

35. ROTTEM, S., A. KALKSTEIN, and N. CITRI :
Incorporation of penicillinase into reaggregated Mycoplasma membranes
Biochim. Biophys. Acta 241, 593-599, 1971

36. ROTTEM, S., and S. RAZIN :
Isolation of mycoplasma membranes by digitonin
J. Bacteriol. 110, 699-705, 1972

37. ROTTEM, S., M. HASIN, and S. RAZIN :
Binding of proteins to mycoplasma membranes
Biochim. Biophys. Acta 298, 876-886, 1973

38. SETHI, K.K., and H. BRANDIS :
Killing of mycoplasmas by the antibodies to foreign antigens acquired by the organisms from the growth medium
Med. Microbiol. Immunol. 157, 113-119, 1972

39. SLUTZKY, G.M., S. RAZIN, and I. KAHANE :
Serum lipoproteins as cholesterol donors to mycoplasma membranes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 529-563, 1976

40. THIRKILL, C.E., and G.E. KENNY :
Serological comparison of five arginine-utilizing mycoplasma species by two-dimensional immunoelectrophoresis
Infect. Immun. 10, 624-632, 1974

41. THIRKILL, C.E., and G.E. KENNY :
Antigenic analysis of three strains of Mycoplasma arginini by two-dimensional immunoelectrophoresis
J. Immunol. 114, 1107-1111, 1975

42. WANG, C.S., and R.L. SMITH :
Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100
Analyt. Biochem. 63, 414-417, 1975

43. WILLIAMS, M.H., J. BROSTOFF, and I.M. ROITT :
Possible role of Mycoplasma fermentans in pathogenesis of rheumatoid arthritis
Lancet 1970 II, 277-280, 1970

44. WROBLEVSKY, H., et D. RATANASAVANH :
Étude par immunoélectrophorèse bidimensionelle de la composition antigénique de la membrane de quelques souches de mycoplasmes
Can. J. Microbiol. 22, 1048-1053, 1976

45. YAGUZHINSKAYA, O.E. :
Detection of serum proteins in the electrophoretic patterns of total proteins of mycoplasma cells
J. Hyg. Cambridge 77, 189-198, 1976

46. ZWILLING, R. :
Immunologisches Praktikum
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
1977

Für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung und Beratung möchte ich Herrn Professor Dr. H. Brunner besonders danken. Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern der immunologischen Laboratorien des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit sowie Herrn Wirtz für die Hilfe bei den Tierexperimenten. Für die Anfertigung der photographischen Abbildungen bedanke ich mich bei Frau Hohlweck.

Lebenslauf

Als Sohn des Richters am Landgericht Heinrich-Eugen Stehle und seiner Ehefrau Ingetraud Anna Therese Luise, geborene Raffel ,wurde ich, Wolfgang Matthias Stehle, als älteres von zwei Kindern am 14.07. 1955 in Düsseldorf geboren.
1962 wurde ich in die katholische Volksschule in Krefeld-Fischeln eingeschult, 1966 in das Arndt-Gymnasium in Krefeld aufgenommen, wo ich 1974 die Reifeprüfung ablegte. Vom Wintersemester 1974 bis einschließlich zum Sommersemester 1980 studierte ich an der Universität Düsseldorf Humanmedizin. Das Praktische Jahr durchlief ich von Oktober 1979 bis September 1980 an dem Akademischen Lehrkrankenhaus Neuß. Im November 1980 erlangte ich die Approbation als Arzt.

Druck und Einband:

Rudolf Stehle GmbH & Co KG, Düsseldorf